

目 录

简	介				
-----	-----				
-	2				
原	理				
-----	-----				
-	2				
保	质	期			
-----	-----	-----			
	2				
试	剂	盒	组	成	
-----	-----	-----	-----	-----	
				3	
准	备	工	作		
-----	-----	-----	-----		
			4		
方 案 1 : 从 1 m l 抗 凝 血 液 中 提 取 淋 巴 细 胞 基 因 组					
D N A - - - - -			5		
方 案 2 : 从 5 m l 抗 凝 血 液 中 提 取 淋 巴 细 胞 基 因 组					
D N A - - - - -			6		
常	见	问	题	回	答
-----	-----	-----	-----	-----	-----
					8

简介

HiPure Blood gDNA Kits 为抗凝血液样品的淋巴细胞基因组 DNA 提取提供了一个简单经济的解决方案。试剂盒基于硅胶柱纯化技术，提取过程中无需使用有毒的酚氯仿抽提，也无需进行耗时的醇类沉淀，整个提取过程只需 40 分钟。得到的 DNA 可直接用于 PCR, Southern blot 等实验。

原理

HiPure 硅胶柱是采用高结合力的玻璃纤维滤膜为基质。滤膜在高浓度离子化剂(如盐酸胍或异硫氰酸胍)条件下，可通过氢键和静电吸附核酸，而蛋白质或其它杂质不被吸附而去除。吸附了核酸的滤膜经洗涤去除蛋白质和盐，最后可以用低盐缓冲液(如 Buffer TE)或水，洗脱出滤膜上吸附的核酸。得到的核酸纯度高，可直接用于各种下游实验。

试剂盒基于硅胶柱纯化方式。抗凝血液经红细胞裂解液处理后，离心收集得到白细胞。白细胞经蛋白酶 K 和裂解液消化后，加入乙醇后，转移至柱子中过滤，DNA 被吸附上柱子的膜上，而蛋白质则不被吸附而随而滤液流出去除。柱子经 Buffer GW1 洗涤蛋白质和其它杂质，经 Buffer GW2 洗涤去除盐分，最后 DNA 被低盐缓冲液(10Mm Tris, pH8.5)洗脱。洗脱的 DNA 可直接用于 PCR、Southern blot 等实验。

保质期

HiPure Blood gDNA Midi Kit 可在室温下(15~25℃)干燥保存 12 个月。长期保存时需置于 2~8℃。低温下，Buffer AL 可能会有沉淀形成，需 55℃ 水浴让沉淀完全溶解。

组 成

HiPure Blood gDNA Mini Kit

产品编号	D3012-01	D3012-02	D3012-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure gDNA Mini Columns	10	50	250
2ml Collection Tubes	10	50	250
10 x Buffer RBC	10 ml	30 ml	150 ml
Buffer AL	4 ml	20 ml	70 ml
Buffer DW1	6 ml	30 ml	150 ml
Buffer GW2	5 ml	20 ml	2 x 50 ml
Proteinase K	2.2 mg	12 mg	55 mg
Protease Dissolve Buffer	1 ml	1 ml	3 ml
Buffer AE	3 ml	30 ml	100 ml
说明书	1	1	1

HiPure Blood gDNA Midi Kit

产品编号	D3013-01	D3013-02	D3013-03
纯化次数	10 次	50 次	250 次
HiPure gDNA Midi Column	10	50	250
15ml Collection Tubes	10	50	250
10 x Buffer RBC	40 ml	160 ml	2 x 800 ml
Buffer AL	15 ml	60 ml	300 ml
Buffer DW1	40 ml	180 ml	850 ml
Buffer GW2	20 ml	100 ml	2 x 200 ml
Proteinase K	12 mg	55 mg	270 mg
Protease Dissolve Buffer	1 ml	3 ml	15 ml
Buffer AE	20 ml	100 ml	500 ml
说明书	1	1	1

需要准备材料和工具

- 无水乙醇(96~100%)
- 65℃水浴锅
- 离心机
- 灭菌的离心管
- (中量)灭菌水
- 溶解 Proteinase K: 加入适量的 Protease Dissolve Buffer 至 Proteinase K 干粉中, 使其终浓度为 20mg/ml。轻轻颠倒混匀 15-30 次让 Proteinase K 充分溶解。分装保存于-20℃。
- 用无水乙醇稀释 Buffer GW2, 并于室温保存。

D3012-01	加入 20 ml 无水乙醇
D3012-02	加入 80 ml 无水乙醇
D3012-03	每瓶中加入 200 ml 无水乙醇
D3013-01	加入 80 ml 无水乙醇
D3013-02	每瓶中加入 400 ml 无水乙醇
D3013-03	每瓶中加入 800 ml 无水乙醇

方案 1: 从小于 1ml 抗凝血液中提取淋巴细胞基因组 DNA

该方案适合于 0.1-1ml 抗凝血液中提取淋巴细胞基因组 DNA。

1. 转移◆<0.4ml 血液至 2ml 离心管中；或■0.5-1ml 血液至 15ml 离心管中。
2. 加入 3 倍体积 1 x Buffer RBC 至样品中。颠倒混匀 5~10 次。静置 5 分钟，其间偶尔颠倒混匀几次。
举例：若血液体积为 1ml，则需加入 3ml 1 x Buffer RBC。
3. ◆14,000 x g 离心 30 秒收集白细胞；或■2,000 x g 离心 5 分钟收集白细胞。
4. 倒弃上清液，反扣于吸水纸上吸尽残液。加入 2 倍体积 1 x Buffer RBC 至白细胞沉淀中。涡旋重悬白细胞。
举例：若血液体积为 1ml，则需加入 2ml 1 x Buffer RBC。
5. ◆14,000 x g 离心 30 秒收集白细胞；或■2,000 x g 离心 5 分钟收集白细胞。
6. 倒弃上清液，反扣于吸水纸上吸尽残液。加入 200 μ l 1 x Buffer RBC 和 10 μ l Proteinase K 至白细胞中，涡旋 30-60 秒充分打散细胞。
举例：若重悬后有明显的团块，用移液枪吸打几次充分打散细胞团。
7. 加入 220 μ l Buffer AL 至样品中。涡旋混匀 30 秒，65 $^{\circ}$ C 水浴 30 分钟，其间涡旋混匀几次。
8. 加入 220 μ l 无水乙醇至样品中。涡旋混匀 30 秒。短暂离心收集管壁上的液滴。
9. 把 gDNA 结合柱装在 2ml 收集管中。转移第 8 步获得的混合液(包括沉淀)至柱子中。10,000 x g 离心 1 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 500 μ l Buffer DW1(已用乙醇稀释)至柱子上。10,000 x g 离心 1 分钟。
11. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。加入 650 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 x g 离心 1 分钟。
注：Buffer GW2 须用无水乙醇稀释。按瓶子标签或说明书指示进行稀释。
12. 倒弃滤液，把柱子装回收集管中。再加入 650 μ l Buffer GW2(已用乙醇稀释)至柱子中。10,000 x g 离心 1 分钟。

13. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。10,000 × g 离心 2 分钟。
14. 将柱子装在新的 1.5ml 离心管中。加入 **100μl 预热至 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央**。放置 5 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
15. 再加入 **100μl 预热至 65°C Buffer AE 至柱子的膜中央**。放置 5 分钟。10,000 × g 离心 1 分钟。
若纯化的 DNA 需要长期保存，建议用 Buffer TE 来洗脱 DNA。若需获得的最高产量，建议进行第三次洗脱。
16. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存 2~8°C，长期保存需保存于-20°C。

方案 2: 从小于 5ml 抗凝血液中提取淋巴细胞基因组 DNA

该方案适合于 1-5ml 抗凝血液中提取淋巴细胞基因组 DNA。

1. 转移◆1-3ml 血液至 15ml 离心管中；或■4-5ml 抗凝血液至 50ml 离心管中。
2. 加入 3 倍体积 1 × Buffer RBC 至样品中。颠倒混匀 5~10 次。静置 5 分钟，其间偶尔颠倒混匀 2 次。
举例：若血液体积为 5ml，则需加入 15ml 1 × Buffer RBC。试剂盒提供 10 × Buffer RBC，使用前用灭菌水稀释至 1 × Buffer RBC。
3. 2,000 × g 离心 5 分钟收集白细胞。
4. 倒弃上清液，反扣于吸水纸上吸尽残液。加入 2 倍体积 1 × Buffer RBC 至白细胞沉淀中，涡旋混匀 30 秒。
举例：若血液体积为 5ml，则需加入 10ml 1 × Buffer RBC。
5. 2,000 × g 离心 5 分钟收集白细胞。
6. 倒弃上清液，反扣于吸水纸上吸尽残液。加入 1ml 1 × Buffer RBC 和 50μl Proteinase K 至细胞沉淀中。剧烈涡旋混匀 30 秒充分打散细胞。
举例：若重悬后有明显的团块，用移液枪吸打几次充分打散团块物质。

7. 加入 **1ml Buffer AL** 至样品中。涡旋混匀 30 秒，65°C 水浴 30 分钟，其间涡旋混匀 2-3 次。
8. 加入 **1ml 无水乙醇**至样品中。涡旋 30 秒混匀。短暂离心收集管壁上的液滴。
举例：若这一步出现明显的絮状沉淀，用移液枪吸打尽量打散。
9. 把 HiPure DNA 中量柱装在 15ml 收集管中。把混合液(第 8 步)倒入至 DNA 中量柱子中。4,000 x g 离心 3 分钟。
10. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 **3ml Buffer DW1** 至柱子上。静置 2 分钟。4,000 x g 离心 3 分钟。
11. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 **3ml Buffer GW2**(已用乙醇稀释)至柱子中，4,000 x g 离心 3 分钟。
注：Buffer GW2 在使用之前，必须用无水乙醇进行稀释。按瓶子标签指示进行稀释。
12. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。加入 **3ml Buffer GW2**(已用乙醇稀释)至柱子中，4,000 x g 离心 3 分钟。
13. 倒弃流出液，把柱子装回收集管中。4,000 x g 离心 10 分钟。
14. 将柱子转移至新的 15ml 离心管。加入 **500µl 预热至 65°C Elution Buffer** 至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。4,000 x g 离心 5 分钟。
15. 再加入 **500µl 预热至 65°C Elution Buffer** 至柱子的膜中央。室温放置 3 分钟。4,000 x g 离心 5 分钟。
16. 丢弃 DNA 结合柱，把 DNA 保存于-20°C。

常见问题解答

该列表可能有利于解决您在提取过程中所碰到的问题。Magen 的技术人员也可以随时为您提供服务，若您对试剂盒存在问题和建议，或您在分子生物学碰到问题，都请您联系我们。我们将竭尽所能为您排忧解难。

现象	原因及解决方法
DNA 溶液带颜色	
红细胞去除不干净	分离白细胞时，要尽量去除残液，以防止红细胞的污染。
Proteinase K 活性下降	使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20℃。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
样品裂解不充分	得到的白细胞沉淀，在加入 Buffer AL 之前，必须充分涡旋或吸打把细胞打散。
DNA 产量低	
柱子堵塞	样品用量太多，减少样品用量。
样品裂解不充分	得到的白细胞沉淀，在加入 Buffer AL 之前，必须充分涡旋或吸打把细胞打散。
Proteinase K 活性下降	分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。Proteinase K 与 Buffer AL 不能预先混合。
Buffer GW2 中乙醇没有加入	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。
洗脱效率不够	洗脱时 Buffer AE 预热至 70℃，并加到膜中央，室温放置 3 分钟。Buffer AE 的洗脱体积不够。进行第三步洗脱。
OD260/OD280 比值不正常	
RNA 污染	加入 RNASE 酶消化至裂解液中进行消化
Proteinase K 活性下降	重新制备 Proteinase K。使用后 Proteinase K 必须立即保存于-20℃。分装保存 Proteinase K，避免反复冻融。
样品裂解不充分	得到的白细胞沉淀，在加入 Buffer AL 之前，必须充分涡旋或吸打把细胞打散。
Buffer GW2 中乙醇没有加入	按说明书或瓶子标签所示，加入正确的乙醇。